



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 27 170.7

Anmeldetag: 31. Mai 2000

Anmelder/Inhaber: Schering Aktiengesellschaft, Berlin/DE

Bezeichnung: Humanes PEM als Target für die Fertilitätskontrolle

IPC: C 12 Q, C 12 N und A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. Mai 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weihmayr

Humanes PEM als Target für die Fertilitätskontrolle

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft das humane PEM-Polypeptid, das für die Spermienreifung eine wesentliche Rolle spielt und die dafür kodierende Nukleinsäure. Die Erfindung umfasst die Verwendung von PEM als Target in der männlichen Fertilitätskontrolle und für die Behandlung und Diagnose der männlichen Infertilität. Zur Erfindung gehört auch ein Selektionsverfahren für PEM-Antagonisten sowie die Herstellung von Bindungsmolekülen, die spezifisch PEM erkennen. Weiterhin sind Gene, die durch das PEM-Gen reguliert sind, Teil dieser Erfindung.

10

15

Die Absicht, Proteine des männlichen Reproduktionstraktes oder Spermienproteine als Zielgruppe zur nicht-hormonellen Kontrazeption zu nutzen, ist seit mehreren Jahrzehnten bekannt. Zum Beispiel wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ein Projekt mit dem Namen "Vaccines for fertility regulation" unterstützt (P.D. Griffin, Hum. Reprod., 1991, 6:166-172). Verschiedene Spermien-Proteine wie z. B. PH-20, SP-10, FA-1, FA-2, CS-1, NZ-1, NZ-2 und die Lactat-Dehydrogenase C4 wurden als Kandidaten für Immunokontrazeption vorgeschlagen (R. K. Naz, Immunol. Rev., 1999, 171:193-202). Immunisierungsversuche mit PH-20 zeigten, dass sowohl männliche als auch weibliche Tiere dadurch vollständig und reversibel infertil werden (P. Primakoff et al., Nature, 1988, 335:543-546). Der Einsatz des intraakrosomalen Spermienproteins SP-10 als Antigen ruft eine Immunantwort bei Frauen, die die Fertilität senkt, hervor (R.W. Wright et al., Biol. Reprod., 1990, 42:693-701). Aktive Immunisierung von Tieren mit FA-1 bewirkt eine andauernde und reversible Hemmung der Fertilität (R. K. Naz and X. Zhu, Biol. Reprod., 1998, 59:1095-1100).

20

25

30

PEM ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Homeobox-Familie gehört. Die entsprechende cDNA wurde aus der Maus (M. F. Wilkinson et al., Dev. Biol., 1990, 141:451-455) und aus der Ratte (S. Maiti et al., J. Biol. Chem., 1996, 271:17536-17546) kloniert. PEM-Transkripte sind abundant und selektiv im männlichen Genitaltrakt exprimiert. In der Maus wurde die PEM-Expression hauptsächlich im Hoden nachgewiesen, während in der Ratte PEM hauptsächlich im Nebenhoden zu finden ist (K. A. Sutton et al., J. Androl., 1998, 19:21-30). Die in vivo Expression des PEM-Gens ist in diesen Organen durch Androgene reguliert. Weiterhin wurden PEM-Transkripte im Muskel und in Makrophagen beschrieben, aber in diesen Fällen scheint die PEM-Expression nicht durch Androgene reguliert zu sein, was sich auf die Benützung unterschiedlicher Promotoren zurückführen lässt (S. Maiti et al., J. Biol. Chem., 1996, 271:17536-17546). Trotz des unauffälligen Phenotyps der PEM-Knock-Out-Maus (J. L. Pitman et al., Dev. Biol., 1998, 202:196-214) ist es zu vermuten, dass das humane PEM eine essentielle Rolle in der Spermatogenese oder/und in der Spermienreifung spielt. PEM ist der einzig bekannte Transkriptionsfaktor, dessen Expression durch Androgene reguliert wird (S. Maiti et al., J. Biol. Chem., 1996, 271:17536-17546).

Bislang konnte das humane PEM-Ortholog nicht gefunden werden, was auf eine geringe Sequenzkonservierung in unterschiedlichen Organismen hinweist, wie bereits durch die schwache Identität (73 %) zwischen Maus-PEM und Ratten-PEM festzustellen ist (S. Maiti et al., Genomics, 1996, 34:304-316).

Die Erfindung betrifft die Identifizierung des humanen PEM durch Musterung öffentlicher DNA-Datenbanken. Es konnte sowohl die komplette kodierende PEM-cDNA-Sequenz wie auch die Struktur des PEM-Gens ermittelt werden. Die Hemmung von PEM kann zur Hemmung der Spermien-Entstehung bzw. -Reifung führen und stellt somit einen neuartigen Weg für Kontrazeptivansätze dar. Weiterhin kann das Screening nach funktionellen

Mutationen im PEM-Gen als diagnostisches Mittel zur Bestimmung der Ursachen von Infertilität verwendet werden. Durch Wiederherstellen der PEM-Funktion (z.B. durch Gentherapie) kann die Fertilität der Patienten wieder hergestellt werden.

5

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung von humanem PEM oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure als Zielsubstanz zur Herstellung eines Mittels für die Fertilitätskontrolle. Vorzugsweise wird das humane PEM von (a) dem kodierenden Bereich der in SEQ ID No. 1 gezeigten Nukleinsäuresequenz, (b) einer der Sequenz gemäß (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes oder/und (c) einer mit den Sequenzen gemäß (a) oder/und (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierenden Nukleinsäuresequenz kodiert. Besonders bevorzugt besitzt das humane PEM die in SEQ ID No 2 gezeigte Aminosäuresequenz oder eine dazu mindestens 80 %, vorzugsweise mindestens 90 %, identische Aminosäuresequenz.

10

15

Der Begriff "stringente Hybridisierung" gemäß vorliegender Erfindung wird dabei wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press (1989), 1.101-1.104) verwendet. Demnach spricht man von Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, wenn nach Waschen für eine Stunde mit 1 x SSC und 0,1 % SDS bei 55°C, vorzugsweise bei 62°C und besonders bevorzugt bei 68°C, insbesondere für eine Stunde mit 0,2 X SSC und 0,1 % SDS bei 55°C, vorzugsweise bei 62°C und besonders bevorzugt bei 68°C, noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet wird. Eine unter derartigen Waschbedingungen mit einer in SEQ ID No. 1 gezeigten Nukleotidsequenz oder einer damit im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleotidsequenz hybridisierende Sequenz wird von der vorliegenden Erfindung erfasst.

20

25

30

Insbesondere erfasst die vorliegende Erfindung natürliche, allelische Variationen von PEM, bei denen es sich gegebenenfalls auch um

funktionelle Mutationen handeln kann. Darüber hinaus werden auch rekombinante Varianten, beispielsweise funktionelle Teilfragmente (wie etwa die "Divergent Paired Class" Homeodomäne wie für die Maus von Rayle (Develop. Biol. 146 (1991), 255-257) beschrieben) von der vorliegenden Erfindung erfasst.

Besonders bevorzugt weist das humane PEM die in SEQ ID No. 2 gezeigten Aminosäuresequenz oder eine dazu mindestens 80 % und insbesondere mindestens 90 % identische Sequenz auf. Die Identität I % wird dabei nach folgender Formel berechnet:

$$I = n/L \times 100 \%,$$

wobei n für die Anzahl identischer Aminosäuren der beiden, miteinander verglichenen Sequenzen und L für die Länge des zum Vergleich herangezogenen Sequenzabschnitts steht.

Eine Hemmung von humanem PEM kann zur Hemmung der Fertilität und insbesondere zur Hemmung der Spermatogenese bei männlichen Säugern eingesetzt werden. Dies ist von großer Bedeutung bei der humanen Empfängnisverhütung, aber auch in der Veterinärmedizin zur Populationskontrolle. Die Hemmung von PEM kann durch Expressionsverringerung mittels Antisense-Nukleinsäuren oder Ribozymen oder auf Proteinebene durch Verwendung von Inhibitoren wie Anti-PEM-Antikörpern oder niedermolekularen Antagonisten erfolgen. Die Herstellung von Antisense-Molekülen und Ribozymen kann beispielsweise wie bei Sczakiel (Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7 (1997), 439-444, Lavrovsky et al. (Biochem. Mol. Med. 62 (1997), 11-22) und Thompson (Methods Enzymol. 306 (1999), 241-260) beschrieben erfolgen. Polyklonale Antikörper gegen humanes PEM können durch Immunisierung von Versuchstieren mit humanem PEM oder Fragmenten davon, gegebenenfalls an einen Träger wie Keyhole-Limpet-Hämocyanin, und Gewinnung der

resultierenden Antikörper aus dem immunisierten Versuchstier erfolgen. Monoklonale Antikörper können beispielsweise durch Fusion von Milzzellen des immunisierten Versuchstiers mit Myelomzellen nach der Methode von Köhler und Milstein oder Weiterentwicklungen davon erhalten werden.

5 Niedermolekulare Inhibitoren von PEM können durch ein Screening Verfahren wie im Folgenden ausführlich erläutert, identifiziert werden.

Andererseits kann eine Aktivierung von humanem PEM zur Erhöhung der Fertilität eingesetzt werden. Auch hier sind Anwendungen sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin möglich. Die Aktivierung

10 von PEM kann beispielsweise durch Erhöhung der PEM-Expression in Zielzellen, z.B. Sertoli-Zellen im Hoden oder/und Epithelzellen im Nebenhoden, mittels gentherapeutischer Methoden erfolgen. Hierzu kann eine für PEM kodierende Nukleinsäure unter Kontrolle eines in der Zielzelle

15 aktiven Promotors mittels geeigneter Gentransfervektoren, z.B. viraler Vektoren wie etwa Adenoviren, Retroviren, Adeno-assoziierten Viren oder Vacciniaviren, oder Plasmiden, in die Zielzelle eingeführt und dort zur Expression gebracht werden. Geeignete gentherapeutische Verfahren sind z.B. in Gomez-Navarro et al. (Eur. J. Cancer, 35 (1999), 867-885)

20 beschrieben. Weiterhin kann eine Aktivierung von PEM durch niedermolekulare Wirksubstanzen erfolgen, die durch ein wie im Folgenden beschriebenes Screening Verfahren identifiziert werden können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bereitstellung

25 von neuen Mitteln für die Fertilitätskontrolle. Die Identifizierung dieser neuen Mittel erfolgt dadurch, dass man die Fähigkeit von Testsubstanzen zur Modulation von humanem PEM bestimmt. Diese Bestimmung kann als Hochdurchsatz-Test durchgeführt werden, bei dem eine Vielzahl von Testsubstanzen parallel untersucht wird. Der Test kann auf zellulärer Basis

30 durchgeführt werden, wobei Zellen verwendet werden können, die mit dem Gen für das humane PEM transfiziert sind und in der Lage sind, eine Überexpression dieses Gens zu bewirken. Andererseits können auch Zellen

getestet werden, die ein vollständig oder teilweise defektes PEM enthalten, beispielsweise Zellen, die in mindestens einem Allel, vorzugsweise in beiden Allelen ein defektes, humanes PEM Gen enthalten. Die für die Identifizierung neuer Wirksubstanzen verwendeten Testzellen sind vorzugsweise
5 Säugerzellen, insbesondere humane Zellen. Alternativ kann ein Test auf molekularer Basis durchgeführt werden, wobei das humane PEM in Form von Zellextrakten oder in einer im Wesentlichen isolierten und gereinigten Form, gegebenenfalls auch in Form eines aktiven Fragments, eingesetzt wird.

10 Das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von neuen Mitteln zur Fertilitätskontrolle kann weiterhin die Formulierung von auf humanes PEM modulatorisch wirkenden Testsubstanzen oder davon abgeleitete Verbindungen zu einem Arzneimittel umfassen.

15 Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Diagnostikverfahren, bei dem die Expression oder/und die Funktionalität von humanem PEM in einer Probe bestimmt wird. Die Probe stammt vorzugsweise von einem Patienten, der einer Fertilitätsbestimmung unterzogen werden soll. Die Bestimmung
20 von PEM kann auf Nukleinsäureebene, z.B. auf DNA-Ebene beispielsweise durch Southern Blot oder Bestimmung von Einzelnukleotid-Polymorphismen, auf Transkriptebeine durch Bestimmung der Expressionshöhe, des Expressionsmusters oder der Transkriptlänge oder auf Proteinebene, z.B. durch immunhistochemische oder immuncytochemische Methoden oder
25 durch Funktionsmessungen erfolgen. Die Bestimmung von Einzelnukleotid-Polymorphismen erlaubt die Identifizierung und Diagnostik funktioneller Mutationen, welche in Patienten ursächlich für eine Infertilität sein können.

30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Zelle, die mit einer für das humane PEM kodierenden DNA oder einem Fragement davon transfiziert ist und mindestens eine exogene Kopie dieser DNA enthält. Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Zelle, die in mindestens einem Allel ein

defektes PEM-Gen enthält, beispielsweise ein mittels homologer Rekombination disruptiertes PEM-Gen. Diese Zellen können ebenso wie die Nukleinsäuren, die für humanes PEM oder ein Fragment davon kodieren, oder das humane PEM-Protein selbst oder ein Fragment davon zur Identifizierung und Charakterisierung von Mitteln zur Fertilitätskontrolle eingesetzt werden.

Schließlich betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von Genen, die durch das humane PEM-Gen reguliert sind, wobei man den Einfluss von humanem PEM auf die Genexpression in humanen Zellen testet. Dieses Testen kann beispielsweise durch Transkriptomanalyse, z.B. nach den von Kozian und Kirschbaum (Trends Biotechnol. 17 (1999), 73-78) beschriebenen Methoden oder durch Proteomalyse nach den von Dutt und Lee (Curr. Opin. Biotechnol. 11 (2000), 176-179) beschriebenen Methoden erfolgen. Die durch das Verfahren identifizierten Gene und deren Verwendung als Zielsubstanz zur Herstellung eines Mittels für die Fertilitätskontrolle sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Abbildungen erläutert werden.

Es zeigen:

SEQ ID No. 1 die Nukleotidsequenz eines Stranges der humanen PEM cDNA (die Sequenz des Komplementärstranges ist ebenfalls Bestandteil von SEQ ID No. 1)

SEQ ID No. 2 die Aminosäuresequenz von humanem PEM

SEQ ID No. 3 die genomische humane PEM-Sequenz.

Ausgehend von der murinen PEM-Sequenz (Wilkinson et al., (1990), supra) wurden humane EST-Klone und humane genomische Klone gefunden, die eine genügend hohe Homologie aufweisen, um als PEM-Ortholog zu gelten. Der humane genomische Lokus konnte zu Xq 25-26 definiert werden.

5

Die in EST-Datenbanken identifizierte cDNA-Sequenz ist in SEQ ID No. 1 und die Protein-kodierende Sequenz ist in SEQ ID No. 2 dargestellt. Die genomische Sequenz konnte auf diese Weise ebenfalls identifiziert werden und ist in SEQ ID No. 3 dargestellt (entsprechend einem Ausschnitt der Nukleotide 16000 - 170967 aus Genbank Accession No. AC005023). Das initiale Exon reicht von Nukleotid 168 439 bis 168 042. Ein internes Exon reicht von Nukleotid 165 491 bis 165 446 und das terminale Exon reicht von Nukleotid 161 927 bis 161 817 (111 Nukleotide). Im Bereich der Nukleotide 161 698 bis 161 693 befindet sich ein Polyadenylierungssignal.

10

Ansprüche

1. Verwendung von humanem PEM oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure als Zielsubstanz zur Herstellung eines Mittels für die Fertilitätskontrolle.
2. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass das humane PEM von (a) dem kodierenden Bereich der in SEQ ID No. 1 gezeigten Nukleinsäuresequenz, (b) einer der Sequenz gemäß (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes oder/und (c) einer mit den Sequenzen gemäß (a) oder/und (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierenden Nukleinsäuresequenz kodiert ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass das humane PEM die in SEQ ID No. 2 gezeigte Aminosäuresequenz oder eine dazu mindestens 80 % identische Aminosäuresequenz aufweist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 - 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Hemmung von PEM zur Verringerung der Fertilität eingesetzt wird.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 - 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine Aktivierung von PEM zur Erhöhung der Fertilität eingesetzt wird.

6. Verfahren zur Identifizierung von Mitteln für die Fertilitätskontrolle,
dadurch gekennzeichnet,
dass man die Fähigkeit von Testsubstanzen zur Modulation von PEM
bestimmt.

5

7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass man einen Hochdurchsatz-Test durchführt.

10

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass man einen Test auf zellulärer Basis durchführt.

15

9. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass man einen Test auf molekularer Basis durchführt.

20

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 - 9,
weiterhin umfassend die Formulierung der modulatorisch wirkenden
Testsubstanzen oder davon abgeleitete Verbindungen zu einem
Arzneimittel.

25

11. Verfahren zur Fertilitätsdiagnostik,
dadurch gekennzeichnet,
dass man die Expression oder/und Funktionalität von humanem PEM
in einer Probe bestimmt.

30

12. Zelle,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie mit einer für humanes PEM oder ein Fragment davon
kodierenden Nukleinsäure transfiziert ist.

13. Humane Zelle,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie in mindestens einem Allel ein defektes PEM-Gen enthält.
- 5 14. Verfahren zur Identifizierung von Genen, die durch das humane PEM-
Gen reguliert sind,
dadurch gekennzeichnet,
dass man den Einfluss von humanen PEM auf die Genexpression in
humanen Zellen testet.
- 10 15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine Transkriptoren- oder Proteomanalyse durchführt.
- 15

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft das humane PEM-Polypeptid, das für die
5 Spermienreifung eine wesentliche Rolle spielt und die dafür kodierende
Nukleinsäure. Die Erfindung umfasst die Verwendung von PEM als Target
in der männlichen Fertilitätskontrolle und für die Behandlung und Diagnose
der männlichen Infertilität. Zur Erfindung gehört auch ein
10 Selektionsverfahren für PEM-Antagonisten sowie die Herstellung von
Bindungsmolekülen, die spezifisch PEM erkennen. Weiterhin sind Gene, die
durch das PEM-Gen reguliert sind, Teil dieser Erfindung.

/home/ei/ANM/22756PDE 31.05.2000

SEQ ID No. 1

1 TCCAACATCA GCGCTCCAG CCATGGCGCG TTCGCTCGTC CACGACACCG
51 TGTTCCTACTG CCTGAGTGTA TACCAGGTAA AAATAAGCCC CACACCTCAG
101 CTGGGGGCGAG CATCAAGCGC AGAAGGCCAT GTTGGCCAAG GAGCTCCAGG
151 CCTCATGGGT AATATGAACC CTGAGGGCGG TGTGAACCAC GAGAACGGCA
201 TGAACCGCGA TGGCGGCATG ATCCCCGAGG GCGGCGGTGG AAACCAGGAG
251 CCTCGGCAGC AGCCGCAGCC CCCGCCGGAG GAGCCGGCCC AGGCGGCCAT
301 GGAGGGTCCG CAGCCCGAGA ACATGCAGCC ACGAACTCGG CGCACGAAGT
351 TCACGCTGTT GCAGGTGGAG GAGCTGGAAA GTGTTTTCCG ACACACTCAA
401 TACCCTGATG TGCCACAAAG AAGGGAAGTT GCCGAAAAGT TAGGTGTGAC
451 TGAAGACAAA GTGCGGGTTT GGTTTAAGAA TAAAGGGCC AGATGTAGGC
501 GACATCAGAG AGAATTAATG CTCGCCAATG AACTACGTGC TGACCCAGAC
551 GACTGTGTCT ACATCGTCGT GGACTAG

SEQ ID No. 2

1 MARSLVHDTV FYCLSVYQVK ISPTPQLGAA SSAEGHVGQG APGLMGNMNP
51 EGGVNHENG M NRDGGMIPEG GGGNQEP RQQ PQPPPEEPAQ AAMEGPQ PEN
101 MQPRT RRTKF TLLQVEELES VFRHTQYPD V PTRRELAENL GVTEDKVRVW
151 FKNKRARCRR HQRELMLANE LRADPDDCVY IVVD*

SEQ ID No. 3

Ausschnitt von 160000-170967 aus AC005023:

>AC005023 ASSEMBLE April 25, 2000 17:03
CAATACAAGAGAATGTCTGTGTTAAGATAAGGGGTTGTGGAGACCAAGGTTCCCATTATG
CAGAGGAAGCCTCCAGGTAGCTGGCTTCAGAGAGAATAGATTGTAAATGTTTCTTACTTG
AGTTGATTCTCTCCTGGATCAAGAAAAAGGCCTGCACAAGAAAGGGGATTCTCTTGAGAA
TGTACATTTCCCCCACAAGAGACAGCTTTGCAGGACTGTTTCAAAATATGACAAAGAAA
CACATAGGGTAAAATACTTTTGATTTCTTTCAAGCCTTGCTATCTGTCATGTGATGCTAT
ACTAGAGTTAGGCTGGAAATTGGTGTCTTATTGCCACAGAGTATGTTAGTCTTAAGTTCT
GTTCTAACGTTAAGACTGGTCAGCTGTACACGAATTCCAAAAGGGAGTAGGGAATAATAA
GGCATGTCTGACGCCTACTTCCTGTCTGACCTGAATAAGTTTTTCAGGTTAACTTTGGA
ATGCCCTTGGCTGAGAGGAGGGATCCATTAGATAGTTGTGGGGCTTCGAATTTTATTTT
TGGTTTACAATAGCATGAACAAAGCAGAGGTCTGACAGCTTCGTTCCAGTGAGTGGATAT
TCTGGAACATTGCTCAGGGTACCATCTTCTTACTCTTCTTTGAGCAGCACTAAATGAAA
GGTCCCCTTTTACCTTGTAATCAGCAGGAAGTGGGATTCTCTCGAAGATGTTGAAGATGA
CAAAATAAACTTAAAGGATTGTTTCTGCTTTTGGAGCTAGGGAAGGTATAACAATATGC
TTTCTGGGCCGGGGGAGGGGAGAAAATGGAGAAGAGCCTCTTTTGGGCTTAATGAAAT
TTTTGCTTGTGTTTCTTTTGAAGCAGCAGGATCTTTGGGGCAGAATAGCTCCTATTCCTC
TGTGTCCCCCACAAAAGGGAGGGCAGTGAACAGAATTGGAGCATAGTGGAGTGGATCA
ACGTTAGCTGCCACCTTCCCATAAATCCTATGAGTAGCCACCTAGGAAGTTTCTCTTTA
GAGTCCAGAATTGGACTGAACTAGTCAGCATAACTGGAAGTCTAGCTTTATCTGGGAATA
CACTGTTGTCTCACCAGGAATCTGCTTACCCCTTCTTGCACATATTTGTGGTCCCTAAA
GGGGCAAGGTGGTGAGGATGGCATAATGGCAGGGGTAGGGAGGGGGAGTGGAGAAGGATG
TATGGGTGAGTGCAAACTCACAATGACGCTTGGTAACTTCTGTGATGTGCAGGGCCTAT
TGTTGATGGCAAGCCAGGGATGTCATTTTATGAAAGATCTCCTTGTGATTTTGTTTAAAT
GGCTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGGATATGGAGTCTCACTCTGTTGCCAGGCTGAAGTGCA
GTGGTGGGATCTTGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCTGGGTTGAGGCTCCCGCATAGCT
GGGATTACTGGTGCCTGCCACCACATCCAGCTAATTTTTTTGTATTTTGTATAGAGACAG
GGTTTCACCATCTTGGCTAGGCTGGTCTTGAAGTCTGACCTCCTGATCCACCCGCTCA
GCCTCCTAAAGTGTTAAGATTACAGGTGTGAGCCACTGCACCTGGCCTTAAATGGCTTTT
TAAAAACAATTTGCACCTATAACCTACTAACCACAATTGGCACACAAAACAAATATATT
GAGAATTTGCCTCTTTATTGATAACATAAGTGCAGAGGAGATAAGGGTAGCCTGAGCGGC

ATGGGCAGCCCAGGTGTCAGTGGCACCAGAAAAACCCATCTCCAACTAGCTCCTGAAGA
AGGATGGCATTCTAGGGCTAGTCCACGACGATGTAGACACAGTCGTCTGGGTCAGCACGT
AGTTCATTGGCGAGCATTAAATCTCTCTGATGTCGCCTACATCTGGCCCTTTTATTCTTA
AACCAAACCTACAATCAGAGGGGAAAAGGGGATTGGTTTAGTATATTGAACAGTTAATGTC
GTAATAGAAAAACACAGGATGCAACTTTATATGCTATTGAGATTTTAACTGCATCAGGA
AAAGCTATTTCCCTCATTGCTAAAATACCTTAGGAAAGTTAACAACATAGCCCGTGGCCCT
TCAGCTCACCCCTAGTGAGGACCAGCTTTGTGCCAAGTCCTGGAATAAGCTTATTACTTT
GTATCTCTCTTCTCCATTTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTA
TTTATTTTTTTGAGACAGGGTCTTGCTGTTTTGCTGGGCTGGGATCCAGTGGTGAATCA
TAGCTCACTGTGACATTGAACCTTCTGGGCTCAAGAGATCCTCCCACCTCACCCCTCCAAG
TAGCTGGTACTAGAGGTACATGCCACTATGCCCAGCTGTTTTAATTTTTCTGTAGAGACA
GGGTCTCGCTATGTTGCCCAGGCTGGACTTGAGCTCCTGGCCTCAAGTGATCTTCCCACC
TTGGTGTCCCAAAGTGTTGGGATTACAAGCGTGAGCCACTGTGCCCAGCCCCAATTTTAA
TATTCCTTAAATGGTTACTTCCAGATATTGGATGCAGTTCTGGCTTATGAGTTGTTCCAGG
TCCTTGCTGTTTGTAAATTCATGCCTGGCAACAGGGTAACAAAAGGTGTGCATCTGACA
AGTGACCATCAACTATCCAGCTGCCTCCTGCTCCCTCCTCACTAGGGAGAGTTTCATCTT
GTTTGTGGGAGAAGTTTCGGCATGGTAAAAAGTGGGCCTAATTTCAAATCATTTTCAGGGG
ATTGTTTAAAAATCCATCTTTAGTATGTAGTAAATAATAGGAAAGAGCGCACTGGAATT
TTAGACAGGTTTCCTTCCAGGATGTCTAAGGGATCATTTCGTCTCTGGCAAGAGAGGCCT
GGACACTGCCTTGATATTTAGCCTGTAGCATTAAAGGAAAGTTGAAACCAGCTCGACCCA
AATTAACCTGAAACTCTCAAAAATCTTTGCTCACCCAATAGTTTAGGGGAAAGAGGCATAC
CATTGTACCAATGCCAAATCTTCGTCTCCAATCTGCTGCACTCTCCAAACCTTCCTGG
GCTCAGGACAAGGTCAGCTCACTCTGTTTTACCTACAGCTCCAGGATCCTGGACTGGAGG
TGCTGTAGCCCAGTAAGGCAGGGCCCCCTAGGCCCTGCTACTCAACCAGGAGATCTGAAT
CCCACCCCTATTCCCTAAGGCAGAAAGGTGGAACCAGCATTTTAGGAAGATGGTTAACAT
CAATGTGGGGGAAGGGTCACAAATATGGCTCCTCCCTAAATATCTGCCAACAATTAAAAA
GCAACAGACAAAAAAGCCTGTCACTTAGATGTCACTATCCTCTCAGCAACCTAGTTAA
CGGAGTTTATATTGTATTTATTACTTTCAAAGTTCTCAAAGTGAATTTGTAAGCTGCA
CAAAGGGCCTTCTTTCTCTACCTGACACGTCTTTTCACTTTCCCAGTTAAGGATTTGCA
GTATTTCTGCTGCATGAGGCCAGTCTCTAAAAGTCTAAAAGAGCTCATTTTGGGAGCTTT
CAAGTGTAACCACTGGTCAAATCTCTATAAACATAACCAAAGTGTAAGTGGGTTAACTGG
TATGTTCTGATACTAGGTCTGCATTCCCAATACTGGTTTCATAAACCAAGTTGCATTACAT
CTGCAAAAGCTATGGGGAACTATGTATTACTTTCTTGGGGGAAATTTATGCTGTATAGT
TTGGAGATACATGAGAGCATTCTGTCTCTTCCCTTATTTGTATCTTGTGGCTCATATTCT
TTTCAGAGCACTAAGGAGAGAACATTATGTGCACTCAGGGAGGAGAAAAACAACCTACCA
AGCCTTGTTTTTCTTTTCTCTGAGTTTGCCTTACCAGCTGGAGAAAAGTGATCCCAACC
TCTTTTCACTTCTCCAACCCGAACCAGGTGTGATTGTGAGTCCACCCTTTGCCATTAGG
ATGCCAGCACTCAGTAACCCGCTTTGTTAGTTTGCTTTTTTGGACAACCCACTACCAGAT
CGGCAGTGCATTTCCCTCACTACACTCACACATGCACTCTGCATAAAAGCTAATAATAAG
GTCATCCTGATTTTTGTTTTTCTTTTTGGGAAAACATCACTTTGATACTATGTATGGT
TTTCTTTGGTCTTAAGTGGTCATCACTTGAATCCTATGACCTACTAATTAGTTAACTAG
CTTAAAGGAATGAAAAGTATTTGAAATTAACATGGGTGTGAATCTACCCATAAATGAGGG
CCACCTCTCCAAACAAATTCAGAAAACCCACCTCTTCAAAAAAGTACCACCAAAAAGAA
ATATAAATCCTTAGATGGATAGAAATTCCTCAAGAGAACAGTCACTTAAACATTTAGTAG
TTTCATAATGTTGAATTTGTATAGTACATGCATAGTATGTGCAAAGCCTATTTTGACCAT
ATTTCTCTCTAACCTTTTACCCTTCTTGGTCAACTGAAATGAATTCAATATTACTCATT
TTGTTTGCTTCATTCTTTAGACAATTTTCCAAAGCATACAAACCTTACAAACCTTCCTCA
ATTTCAAAATAATGTGACTATTTTAGCAATATTTTCAGGTTGACACATCAAAGTATTTTA
GAAAATTAACCTTAGGGCTGCCACTCTCTATACTGCTTTACCAATAACTTAAAAACAAA
CAAAGAAGGACCAGGGGCTTGGACATATAAGCTATCTTCCCATCAGTCTCAGCTTAACTA
AGTATACATTATTTAGTCATGTAATGTGTTCTGTGGGTGAATTAATCCCTCATCCCAATA
TTTATAAATTCATCATTAGCTAAGTGTTTATGCCTGGCCTTAAATAATTTAGTACACT

TGAACCCCTCTTATAACCCTGCTCCTCCCTGCATTAACCTTGAATACTTCTAAGGTAAGACT
GAACCCCAACCATGACTCTACACAGAAATTTGTTCCATAAAGATACCAGCGTTAGAAGGAGT
TGAATTTTATTTATTGGATACATACATATATGTATAATATATAATACACATATGTGTATT
ATACATTATCATACATATATGTATTATATATTACACATATATGTATAATATATAATACAC
ATATGTATTATATATAATACATATATGTATAATATATGTGTTCATATGTATGTATTTGT
TTAATTTTGTATACAGATTAGGAGAAGCAGTTTTTGTGTTTTGTTTTCCCTTAGGAAATCA
TATTCCTAATTGGAATGGGAAAGAGGAAAGAACCATAAGCTGGAGCTTACTTCCTTTTC
TACCGACAAGGAACCCAACTTCAAACTTATTTGTCAACATAAAAAAGACAATAATAAA
AACAACAACCTTTAGAACGTTCAAGGACAAAGCCTTCAAAGCCTTCAATGCCCTGAAGCAGG
TTTTAGAATGGCTGTCTCTCAAATTTGCTTTTTCAAGTGTACTGACCCGCACTTTGTCTT
CAGTCACACCTAAGTTTTTCGGCAAGTTCCTTCTGTGGAGAGAAGATCACACATGGTTAG
TATTCAAAGTTGTGGATGAAATGAAATATATAGTATGTACTATTTACTTCATGCTGTTTT
TACAATTTATAATCTCCCTCACACCTCCCCAAGTATATACTTTTCTCTAATTCACAGC
TCCATGGTTGCTTTAGAAATGGTTTACCCTCATCACGAAATTTAAGGTGACGTTAACAAC
TCAGTAATCAAGAGAAATACCTTTTTTTTTTTAAATTGAGACAAGGTCTCACTCTGTCTC
CTAGGCTGGAGTGCAGTGGTGTGATTTCACTCACTGCAACCTCCGCTCCGGGGTTCAG
ACGATTCTCGTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGCGATTACAGGCACATACCACCATGCCC
AGTTGATTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTTGCCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCG
AACTCCTGCCCCTCAGCCTCCCAAAGTGTGGGATTTGGGGCATGAACCACCGCACCC
GGCCAAGATGAATAATTAATGCATTATTATTATTTTATTATTATTATTGAGACAGGG
TCTCACTGTCGTCTATGTTGGAGTGCAGTGGCAGGATCACTGCTCACTGCAGCCTGCATG
TCCTGGGCTCGAACGATCCTCCTGCCTCAGCCTTCCAAGTGGCTGGGAGTACAGGCACAC
ACCACCACACCCACATGGCTAATTTTTTAAAGTTTTATTAGAGACGGGGTTTTGCCATGT
TGCCCAGGCTGTTCTTGAACCTCCTGGACTCAAGCAACCTTCCCACCTTGGCCTCCCAAAA
GCGCTGGAATTACAGGCCTGAGCCACCGTGCCTGGCCCTAATGCACTATTTTAATAAATA
ACAATTAATGCAAAAATCTGTGATGAGGACCAGGCACTGTGGCTCAGGCCTGTAATCCCA
GCAGTTTGGGAGGCCGAGGCAGGCAAATTGCTTGAGCCCAGGAGTTTGAGACTAGCCTGG
GCAACACGGCGAAACCTTATCTCTACACACAAAAAAATACAAAAATTAGCCAGGTGTGG
TGGCCTGTGCCTGCAGTCCCAGCTACTCAGGGGGCTGACACGGGAGGATGGCTTGAACCC
AGGAAGCAAATGTTGCAGAGAGCTGAAATCGCACTGCTGCACTCCAACCTGGGCCACAGA
GAGAGACTCTGTCTCAAGACAAAAACAAAAAACAGAAAAACAAAAACCAACCAACAA
ACAAAAAAACTATGATGAACAAATTATCAAAATTTTAAATAAAGGAAGGATCTAGCAC
TGTAGTTGCATGACAGTACCTCATTCTCCTTACCCCAATTTCAATAAAATTTATTATTA
AAAACAGACCACAGCTGGGTGTGGTGGCTCACTCCTATAATCCCAGCAACTCAGGAGGCT
GAGATGGGAGGATTGCTTGGGTGACAGATCCCCACTCAACAAAAACAACAACAACA
AAAACAGGCCATCATCACAGGTAATAAAAGAAAAAATACATAACTTGGACTATATCAAAA
TTTAAACTTCTGTATATCAAAAGATGCAATGAACAGAGTAAAAAGACAACCTCATAGAAT
GGAAGGAAATATTTGCAAATCACATCTGATAAGGGGTAAATATCCAGAGTGTATAAAGAA
CTCCTACAACCCAATAACCAAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGCCACTCAGATTTT
AAAATGGGTAAAGGACTTAAAGAGATATTTCTCCAAGAAGATATACAAGTGGCCACTAA
GCACATGAAAGGATGCACAACATCACTAATCATTAGGGAAAAGCAAATCGAAACTACAAT
GAAGTATCACCTCACACCCATTAGGATGGCTATGTAAAAAACCCAGAAAATAACAAGTG
TTGGTGAGGATGTGGAGAACTGGAACCCCATGTACTGTTGGTGTGCACCTGTATCTAT
AAAATGGAATATTATTTAGCCTTAAAAAGGAAGGAAATCTAATATATGCTGCGATATGG
ATGAACCTTGAAGACCTTATGCTAAGTGAATAAGTCAGTGACAAAAATGCAATACTGT
ATGATTCTACTTACATGAGATACCTAGAGTAGTCAAAATCATAGAGACATAAAATAGTAG
AATGGTGGTTGCCAAGGGCTGGGGAAAGGGGAAAGGGGAGTTGCTTAACTGGTATAGA
GACTTAGCTTGGCAAGATGAGAAGAATTCTAGAGATCTATTGCACAACAATGTGAACATA
CTTAACACAACCTGAACCTTATACTTAAAAAGTGGTTTGGACGGTAAATTTTCATATTTCCG
TGTATTTTACCACATCTTTATAAAAGGGAGGCACGGACTAGTTTCCAGGTTTCATTACACA
TAAACATTGCAATAAAACATTTACCTTGATGCCCAGGAGGTAAATATCCCCCTCCACACC
AGCACAAAGGCAGGCAAGGACCCCCAGTGGCTTTTTCTCATGATTGGGTGGGGCAAGGG

AGAGAAAAAGATGCCTCGAAACGAACTTGGAGATCTCGTGGCTCCTGGAGCAGGCCACTT
ACCTTGTGGGCACATCAGGGTATTGAGTGTGTCGGAAAACACTTTCCAGCTCCTCCACCT
GCAACAGCGTGAACCTTCGTGCGCCGAGTTTCGTGGCTGCATGTTCTCGGGCTGCGGACCCT
CCATGGCCCGCTGGGCCGGCTCCTCCGGCGGGGGCTGCGGGCTGCTGCCGAGGCTCCTGGT
TTCCACCGCCGCCCTCGGGGATCATGCCGCCATCGCGGTTTCATGCCGTTCTCGTGGTTCA
CACCGCCCTCAGGGTTCATATTACCCATGAGGCCTGGAGCTCCTTGGCCAACATGGCCTT
CTGCGCTTGATGCTGCCCCAGCTGAGGTGTGGGGCTTATTTTACCTGGTATACACTCA
GGCAGTAGAACACGGTGTCTGGACGAGCGAACGCGCCATGGCTGGAGCGCTGCGCCCCCT
GCACAACTCCGTGGCGTCTGCAGCTGGAGTGGGGGTAGAGGGTGGAGCTAGTTCCTGT
TCTCATGCTTGGTATTGGTTACAGTTGCAATGAGTGGGACTTGCTTATGCGCACAAGCAA
GAGAGGGAATGGAGAGGAGTGGGGGGATGGGAAGTTGGGGGGTGCGGGTGGGGAGTGGGG
GTGTTGCAGGTGGGAGTGGGGGGTGTGAGTGTGGGGTGGGGTGCAGGTGGGGATGGGGG
TGTGGGTGGAGGGTGGGGGGTGCACAGTGAAGGTGGGGGTGCGGGTGAAGGTAGGGGT
GTGGGTGGGGTGGGGGTGCGGGTGGGGGTACATGGTGGGGTGGGGGTAGCGGGTGA
GATGGGAGGTGTGGGTGGAGGGTGGGTGGGGTGGGGGTGGGGGTGGGGGTGAGGG
GTGTGGTATGGGTGCTGGGTGGGGGTGGCAGTTGAGGGTGGAGTGGGGTGGCCAAAACAC
AGGGGCAGTGTGGAGAAGAAAAGGGCCAATAGGAGGCATATATGTATGCAACATGGGGCC
CCAGCTTGCAGCTTTGCTGACTACACCCTACTCGGGCCTAGTTATTACCCTGAGGAAAGC
TGATTTGGGGGCTCAGAGGGGAGGTGAGATCTCACGGTGACCATAGGACGCCTTGAGTAA
AAGTTTGGAGAATATCTCATGGCCTGACCCTCCATATTGGCAGCATGCACAGGGCGCGG
GCTATTAATTAAGCAGAAATGATTGACTGGGGGCTGCTTGTTCAGAGTTCAGCAAAGGC
ACTGAAAGCAGAGCTGCCATGCTCTCTTCAGTGCTGGGATCGGGATCTTGGAGATGGGCA
TGCAGAGCATTCTGGGTGGTAAGATGTGCTCTGCAAGAAATCTAACGCACCCTTTGAGAA
AGTCAACACAGAATAAACACGAGGCTGAATCTGTTAGCCTGAGACTGAATATCTTTGGCT
ATGCAAGAGAAAACCTGTACTCATGGCAAAATGGAGTGCTATAAGGACAAGCAAAAAATAA
ATAAATAAATAAAATCGGGGATGGTATAGGAAGAGCACCAGTAAGGGCATACCTGCCAAA
AATCTCCAATCTTGGGATGGAGATTTGGGATTTATGGATATGCAGCTTACTGGATGTGGG
GCCACTTCTGCTCCACAGAGCCTTGTAACACAGCCTTCCTACCACTGACCCCAATAA
GCCCAATTACGAAGAAAACCCCTGAAGAGCCTGGTGCAGTGGCTCCTGCACTAGTCCCAG
CTACTCAGGAGGCTGAGATGGGAGGATCACTTGAACCCAGGAGTTTGAGGCTGTGGTGAG
CTAGAATCACATGGCAGCACTCCAGCCTGGGCAACAGACAGAGGCCCTTTTCTTTAAAA
TAAATAATAAAATAAGAAATAAAATGAAATGAAAGAAAGGAAAGCGCTAAGAGAGTCTG
TCATGAGGAAGGGCATGGAGATGTCTTTTGGGGTGGACAACCTCATGAATCCTTAATTTT
TCTAGAGATTGTGTGTGTGCTCTTAAGTGATGTTATATACTTTATTTTGTTTTTTAAAA
TATTTTTTAAAAATTTTATTTTTTAAATGTTCTTTTAAAAACTTTCTGTATCTATTTATATC
TATTGGTTATTTGAGGATTTTTTGGCAGCATATATAAATATGCAGACCCTTTGAGTCTGT
AGCCTACCAAGAGAGATAGCTCTCGTCTTCATGGTGATTCTGAGCATGGAAAGGCCCTTG
CACTTGGCAGCATGACAAGGACTAAGCCACTCGCTCCATTAATTGACTGCCATCCACTGG
GCTAAGTGAGATCCTTGCGTCTATCCCTAGTGAGAGAAGAGAGAGGAAGAAGAAGAAAA
ATAGAAAGATAATAAGAAAATAGAAAAAGAAATGAATAAATGTACATTGTGGGGAGCAGG
AAAGGACTACCAGTAATGGGAGGCATCAGCTAGGAGCACAGATCCGAAGCATGACTCACT
GTGTGTCCTAGGACACTGGATGAATCTATCTGGTTCTCAGCTTCCTCACCTATAAAATGG
AGATAACAACAGTGTCTCGATCATAGGGTTTTTCATGAGAGTTCAATGAGGCAAGGCATAC
ATGTAACCTGAACACAGCTCCGACTGCTCACCAGTTGCAAAGTCCAGTGAACAAGAACGAC
GTCTGGTAGAAAGAAAGTGGCTTTATTCCAGAGCTAGTTGAGGGGAAGTAGTACAGGCTG
CCTTGAGGAAGCCACTAAAGCCTTTGGGGCAGAAGGCAGGAGCTTTGAAAGTGGGGCTTG
GCGTGAATGGCATGCAGGGGAGAGGGCGATGAAGTGCAGAGTCTATGTGACTTGCTTCGG
ATGTCTTATCTATCAGGTGGTCTGGCTGGCACCCTCACGGGCAGAGCTAGGTTGTAAGTT
GAGGCAATCTCAATTTGCCTCCTGGTAGGAGAGAGTTCTGGAGGTTCTGGTTTGCTTTA
AGGTTTCGGTCTCTGTAACCTCTAAGTAAACATGTAGTTAGATAAGCTT